

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-505533

(43)公表日 平成11年(1999)5月21日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

C 0 7 F 15/00

G 0 1 N 33/532

F I

C 0 7 F 15/00

F

G 0 1 N 33/532

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁)

(21)出願番号 特願平8-533965
(86) (22)出願日 平成8年(1996)5月8日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)11月10日
(86)国際出願番号 PCT/NL 96/00198
(87)国際公開番号 WO 96/35696
(87)国際公開日 平成8年(1996)11月14日
(31)優先権主張番号 95201197.1
(32)優先日 1995年5月9日
(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (E P)

(71)出願人 クレアテック バイオテクノロジー ベー
一. ファウ.
オランダ国 1101 エーゼット アムステ
ルダム ケイエンベルフウェフ 3
(72)発明者 ハウトホフ, ヘンドリック ヤン
オランダ国 1023 エンバー アムステル
ダム、スヘリンフヴァウダーデュク 125
(72)発明者 レーデュク, ヤン
オランダ国 2334 セーデー ライデン
アントニ デュイックラーン 4.
(74)代理人 弁理士 西教 圭一郎 (外4名)

最終頁に続く

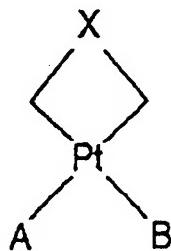
(54)【発明の名称】 標識物と生体有機分子間の白金介在リンカの製造法、生物有機分子の標識法、対象生物物質の検出法および診断用テストキット

(57)【要約】

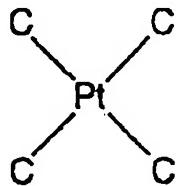
本発明は、特定対象分子の検出に使用することのできる
標識化物質の製造に最適な白金化合物の改良製造法を提
供する。該白金配位化合物は二つの反応性基を持ち、そ
の一方は標識物に置換し、他方は標識すべき物質に置換
する。標識化物質の製造が、適正な原料物質の選択と、
適正な中間体の製造により大幅に改善される。標識効果
が大幅に改善されたことにより、本発明の一部である標
識キットの製造も可能となる。

【特許請求の範囲】

1. 標識化物質のリンカの製造法であって、該リンカが下記式



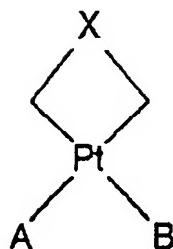
(ただし、式中Xは安定化した架橋を表し、AおよびBは同一または異なって反応性部分を表す) で表される白金化合物から成り、原料物質が下記構造式



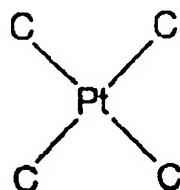
(ただし、式中Cは電気陰性反応性部分を表す) で表される化合物から成ることを特徴とする標識化物質のリンカの製造法。

2. AおよびBが同一であることを特徴とする請求項1記載の方法。
3. Xが脂肪族ジアミンを表すことを特徴とする請求項1～2記載の方法。
4. Xが2～6個の炭素を有するジアミンを表すことを特徴とする請求項3記載の方法。
5. Xがエチレンジアミン基であることを特徴とする請求項2記載の方法。
6. AおよびBがNO₃、SO₃、Cl⁻、I⁻、または他のハロゲンから成る群より選ばれることを特徴とする請求項5記載の方法。
7. Cがハロゲン、NO₃、またはSO₃であることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載の方法。

8. 標識化物質のリンカの製造法であって、該リンカが下記式

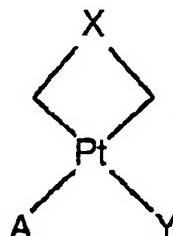


(ただし、式中Xはエチレンジアミン基を表し、AおよびBはNO₃を表す)で表される白金化合物から成り、原料物質が下記構造式

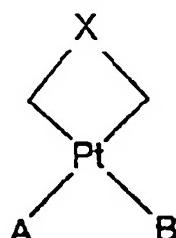


(ただし、式中Cはハロゲンを表す)で表される化合物から成り、かつ、原料物質をエチレンジアミンと反応させ、その生成物をA g NO₃と反応させることを特徴とする標識化物質のリンクの製造法。

9. 式



(ただし、式中A、BおよびXは前項に定義のとおりである)で表される化合物と、YをBに置換し得る標識基とを反応させることを特徴とする式



(ただし、XおよびAは前項に定義のとおりであり、Yは標識基である)で表されることを特徴とする標識物質の製造法。

10. 請求項9の方法によって得られる標識化合物を生物有機分子と反応させ、該A基を生物有機分子と置換することを特徴とする生物有機分子の標識化法。
11. 生物有機分子が蛋白質、ペプチド、DNA分子、RNA分子または（オリゴ）ヌクレオチドであることを特徴とする請求項10記載の方法。
12. 請求項1～8のいずれかの方法で得られるリンカと少なくとも一種の適当な標識物および他の任意の適当な検出手段から成ることを特徴とする生物物質の検出、定量および／または位置特定のための診断テストキット。
13. 請求項9の方法で得られる標識物および任意の他の適当な検出手段から成ることを特徴とする生物物質の検出、定量および／または位置特定のための診断テストキット。
14. 請求項10または11の方法で得られる標識化生物有機分子および任意の他の適当な検出手段から成ることを特徴とする生物物質の検出、定量および／または位置特定のための診断テストキット。

【発明の詳細な説明】

標識物と生体有機分子間の白金介在リンカの製造法、生物有機分子の標識法、対象生物物質の検出法および診断用テストキット

本発明は、白金化合物に基づくリンカ（標識物と生体有機分子間の結合部分）の製造法に関する。白金（配位）化合物は長い間興味深い分子と考えられてきた。これらの化合物とその使用についての総説として、リーディックら（Reedijk et al.）の「構造と結合（Structure and Bonding）、67、53～89ページ、1987」を引用する。特に、シス型白金は抗腫瘍剤として期待できるとして多くの注目を集めている。この白金化合物の抗腫瘍活性は、白金化合物が少なくとも二つの反応性基（好ましくは、互いにシス方向を向いている）を持つことによ来しており、この反応性基がDNA分子の架橋を可能とし、結果としてこれらDNA分子の複製を抑制する。

白金（配位）化合物の他の使用例がPCT出願（WO 92/01699）に開示されており、当該出願によると、二つの反応性部分（脱離基と規定）を持つ白金化合物は蛍光物質と反応して单一の反応性部分を持つ標識化白金化合物を生じ、その反応性部分が核酸、好ましくは、グアニン残基のN-7位で（非共有的に）結合する。本発明は、そのような標識物質のリンカとしての使用に適した白金化合物の改良製造法、標識化物質の製造法、および診断用テストキット製造における当該物質の用途を提供する。

WO 92/01699に開示された原料化合物は、白金（II）（エチレンジアミン）二塩化物または〔白金（II）（エチレンジアミン）（Me₂SO）Cl〕Clである。これら両化合物をリンカとして用いるには、ある種の欠陥がある。第一の化合物は市販品として入手可能であり、第二の化合物（より好ましい）は塩化物塩として合成しなければならない。二塩化物では、塩素イオンClのマーカ基あるいはグアニン基に対する置換反応性が劣る。さらに二個のClイオンが略同等の反応性を有するため、両方のイオンが標識物により置換されてしまうということが起こり、標識化物質が対象生体分子に結合するための反応性部分が残らなくなる。そのため、異なる反応性部分を持つ化合物が標識化使用目

的に極めて好ましい。後者の化合物はこの目的に適うが、この化合物でDNAを完全標識しようとすると数分どころか数時間に及ぶ長時間を要するため、日常使用に適した生成物とはならない。

我々はこの度、式 $P + E_4$ (Eは電子陰性基、好ましくはハロゲン、 NO_3^- または SO_3^-) で表される好適な原料化合物を選択することにより、上述の第一化合物および多くの新規化合物を含む対称性リンカの非常に簡単な信頼性の高い製造法を見出した。実施例に記載のごとく、これら原料化合物とエチレンジアミンとの反応は非常に単純で効果的である。さらに、この反応は標識化物質を製造するための最適な対称性中間体化合物に導き得る。標識化物質を製造するためにこれら原料化合物を使用する利点についてこれまで開示されたことはなく、またこれらの化合物がこの目的に使用されたこともない。これらの化合物を使用する主な利点は、生成する白金化合物の安定な架橋を結合させるに際し、遮断試薬を使用する必要がないことである。もう一つの利点は、生成した中間体化合物が遮断試薬を用いずとも再度標識化が可能であることである。さらに、これらの反応の収率が非常に高い。これら対称性原料化合物を使用するさらなる利点は、次工程反応を阻害したり、収率を低下させたり、あるいは余分な分離工程を要するような異なる生成物が混合物として形成されないということである。本発明による最適中間体化合物は、白金(II) (エチレンジアミン) (NO_3^-)₂である。驚くべきことに、これらの化合物は二重の標識化はほとんど起こらず、この事実はWO/01699の二塩化物と対照的である。この物質は適当な標識基を使用して容易に調製可能であり、しかも生成する標識物質はさらに残りの NO_3^- 基の置換反応によって標識すべきあるいは検出すべき生体有機分子に結合させることができる。その際の反応は、既知の白金化合物との反応よりかなり急速に進行する。さらに、この化合物の製造法および生成する化合物は、DMSOのような毒性の高い物質を必要としない。

中間体化合物は、適当な標識物(マーカとしても知られる)で標識することが

できる。これらの標識物は、放射活性標識物、酵素(検出すべき基質との反応を必要とする)、アビシン、ストレプトアビシン、ビオチンのような特異的に結合

するペア構成成分、ビオシチン、イミノビオシチン、コロイド状色素物質、フッ化クロム（ローダミンなど）、還元性物質（エオジン、エリスロジンなど）、（着色）ラテックスゾル、ジゴキシゲニン、金属ゾルまたは他の粒状ゾル（セレン、炭素など）、ダンシルリジン、抗体、プロテインA、プロテインGなどである。これらの標識物は、リンカに直接またはスペーサ・アーム（好ましくはポリリジン）を介して結合する。核酸と蛋白の標識がとても簡単なため、リンカ・標識化合物を別途キットとして販売することができる。一般のユーザは、それによつて簡単に標識化物質を製造することができるし、当該物質に応じて多くの異種標識物を同じやり方で結合させることもできる。このことは、一回のアッセイで複数種の検出を可能とする。さらに、白金標識化合物（たとえば、WO/01699から）の既知の利点も勿論本発明方法および化合物によって得られる。白金化合物のもう一つの利点は、銀あるいは他の金属結晶を沈殿させるための核としても白金を使用することによって多少なりとも直接にそれらを検出できることである。

利用可能なS（硫黄）あるいはN（窒素）を含むほとんど全ての生体有機分子は、白金化合物で標識することができる。該標識化合物にて本発明により標識可能な最適生体有機分子は、核酸（ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA, RNA, ホモ二本鎖、ヘテロ二本鎖、多重鎖）である。該白金は、非常に簡単にグアニジンのN-7位に（非共有的に）結合することができる。この方法でRNAまたはDNA分子が一本鎖またはそうでない場合であっても簡単に検出することができるが、さらにハイブリッド形成法用のプローブ製造にも使用することができる。この場合、非標識のDNA/RNA分子が当該標識化プローブにハイブリッドする。該白金化合物がハイブリッド形成を阻害することは、まずほとんどない。また、この技術によればプローブを作製する際にヌクレオチドを修飾する必要もなくなる。しかも、蛋白、ペプチドおよび他の生体有機分子も本発明に従い、該標識物質により標識することができる。

本発明の白金化合物は、生体有機分子をニトロセルロース、ナイロンフィルタ

マイクロタイタプレートなどの固体表面に結合するのに好適である。

本発明方法により修飾したヌクレオチドおよびその修飾ヌクレオチドを包含させたオリゴおよびポリヌクレオチド、あるいはこれら新規白金化合物を用いて直接修飾したオリゴおよびポリヌクレオチドは、生物医学研究、臨床診断薬および組換えDNA技術におけるプローブとして用いることができる。

これら広範な用途は当該白金化合物がペプチドに結合し得る、あるいはペプチドと相互に作用し得る検出可能な部分を持ち、かつ、ペプチドとの間で検出可能な安定な複合体を形成する能力を有することによる。いくつかの用法例としては、核酸含有病原物質、たとえば、細菌、ウイルスの検出および同定；抗生物質耐性細菌のスクリーニング；薬理効果に関する遺伝病用動物のスクリーニング；たとえば、21-トリソミ（3染色体性）、鐸状赤血球貧血などの遺伝病の診断；染色体核型同定；および腫瘍細胞の同定などである。

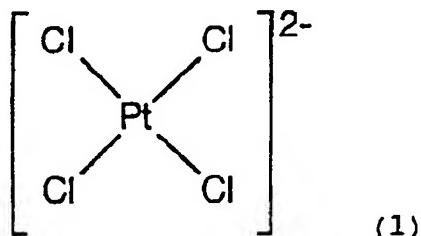
本発明の他の利点および実施態様は、以下の実験の部で明瞭となろう。

実験の部

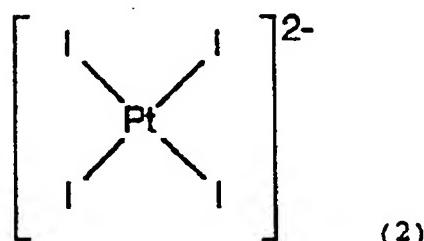
中間体白金化合物の合成

これらの化合物は、以下の工程により調製することができる：

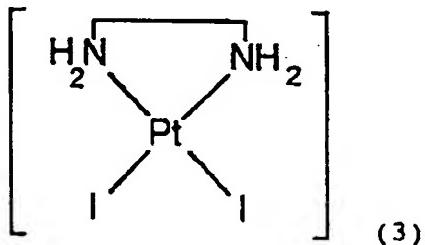
(a) アニオンが下記の構造式(1)を有する化合物を適当な溶媒中、適当な条件下でKIと反応させ、



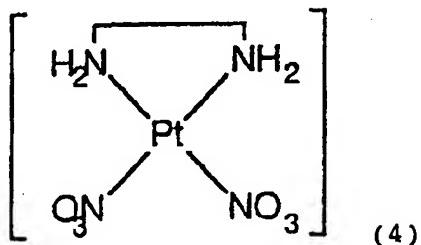
下記のアニオン構造式(2)を有するヨウ素化白金化合物を形成し、



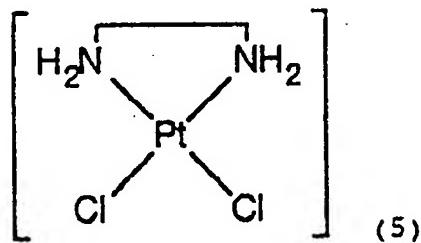
(b) 該ヨウ素化白金化合物(2)を適當な溶媒中エチレンジアミンと反応させて、式Pt(en)I₂で表され、かつ、下記構造式(3)を有するエチレンジアミン・ヨウ素化白金化合物を形成し、



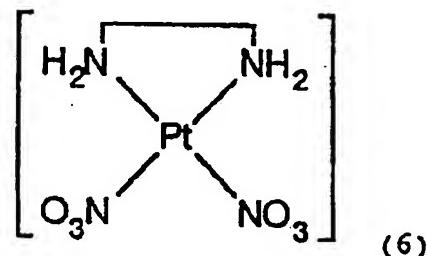
(c) 該化合物(3)を適當な溶媒中、適當な条件下でAgNO₃と反応させ、下記構造式(4)を有する化合物を形成し、



(d) 該化合物(4)を適當な溶媒中、適當な条件下でKClと反応させ、下記構造式(5)を有する化合物を形成し、



(e) 該化合物(5)を適當な溶媒中、適當な条件下でAgNO₃と反応させ、下記構造式(6)を有する化合物を形成し、



(f) 該化合物(6)を、DNAおよび/またはRNA標識物として使用するハプテン結合Pt(en)化合物合成用修飾白金化合物として回収する。

化合物(4)および(6)は勿論同一の化合物であるが、これらを調製する反応はいずれも互換性がある。

実施例1

Pt(en)-ジアミン原料物質の調製

白金メチレンジアミン(NO_3)₂の調製：原料物質

Pt(en)(NO_3)₂

全反応を暗所で実施する。

1gの四塩化白金カリウムK₂PtCl₄(2.4mmol, シグマ)をミリポア濾過水50mlに溶かし、室温で攪拌する。10当量のヨウ化カリウムKI(2.4mmol, 3.999g, シグマ)を加える。溶液は、直ちにオレンジ色から暗赤色(K₂PtI₄)に変わる；5分間攪拌する。

この白金溶液に1当量のエチレンジアミン(2.4mmol, 160.8743μl、メルク11-0.9kg; 161μlのエチレンジアミンを5mlのミリポア水で希釀したもの)をゆっくりと加え、室温で1時間攪拌する。

黄褐色の沈殿Pt(en)I₂を形成するが、上清部は透明となる。

この溶液を1.0μmのメンブランフィルタ(シュライヒャーおよびシュエル; Schleicher & Schuell)で濾過し、沈殿をミリポア水、エタノール、ジエチルエーテルで順次洗浄する。生成したPt(en)I₂を真空乾燥機中、37℃で少なくとも4時間乾燥する。

乾燥したPt(en)I₂を秤量し(-1.07g)、45mlミリポア水・5mlアセトンに懸濁する；溶液は懸濁している。1.95当量のAgNO₃(M=169.9, シグマ)を加える。反応液を室温で一夜攪拌する。

反応液を1.0μmのメンブランフィルタで濾過する；沈殿はヨウ化銀AgIである；濾液は透明でなければならない。

0.5mlのPt(en)(NO_3)₂含有溶液に過剰のKC1またはNaClを加え、過剰のKC1またはNaClをえた直後に白色の沈殿が生じないこと

を確認する。もし白色の沈殿（黄色の沈殿のみで）が生じなければ、全溶液に過剰のKClまたはNaClを加える。黄色の沈殿が生成したところで溶液を濾過し、沈殿($\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$)をミリポア水、エタノール、ジエチルエーテルで洗浄する。

得られた沈殿物を真空乾燥機中、37°Cで少なくとも4時間乾燥する。

乾燥した $\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2$ (M=326.1)を秤量し、45mlミリポア水/5mlアセトンに懸濁し、濁った液を攪拌する。1.95当量のAgNO₃を加え、反応液を室温で一夜攪拌する。溶液はAgClが生成しているために白色となる。

溶液を暗所で濾過して、濾液はロータリエヴァポレーションによりアセトンを除去し、25mlまで濃縮する。次いで、濾液を凍結乾燥する。生成物は、NMRまたは赤外線吸収スペクトル法によりチェックする。下表に元素分析値を示す。

表 I

$\text{Pt}(\text{en})(\text{NO}_3)_2$	Mw = 379.1	20/1 パッチ		
	A	B	$\Delta A-B$	理論値
試料 2 :	5.79 % C	5.15 % C	-0.86 %	6.33 %
	2.03 % H	1.81 % H	+0.19 %	2.11 %
	12.1 % N	13.3 % N	-2.07 %	14.77 %
	48.2 % Pt	48.4 % Pt	-3.16 %	51.46 %
	23.5 % O	23.1 % O	-2.02 %	25.32 %
	<0.2 % Na			

C I 試験を行うには試料不足であった。

C, H, NおよびSの燃焼のためにV₂O₅を添加した。

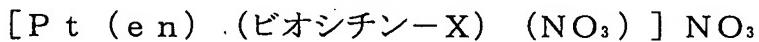
表 I I

化合物 ULS 95 RM005	必要元素	理論値	実験値 (A)%	参照	実験値 (B)%	参照
想定構造式 [Pt(en)(NO ₃) ₂	C	6.3	6.47	F2576		
	H	2.1	2.11	F2576		
	N	14.8	14.48	F2576		
	O					
	S					
	Hal					
	Metal					

実施例2

免疫学的に検出可能なハプテンーPt(en) 化合物の調製

白金エチレンジアミン-ε-(6-(ビオチノイル)アミノ)ヘキサノイル-L-リジン-ナイトレートの調製



全反応を暗所で実施する。

ビオシチン-X 3.1. 6 mg (0.065 mmol, モレキュラ・プローブ・インク、米国) を 1.5 ml のミリポア水に暗所で加え、わずかに加熱（最高 40 °Cまで）して溶解させ、0.4 M の水酸化ナトリウムで pH 7~8 に調整する。 Pt(en)(NO₃)₂ 23.4 mg (M=379.1, 0.062 mmol) (実施例1 参照) をミリポア水 1.0 ml に暗所で加え、わずかに加熱（最高 50 °Cまで）して Pt(en)(NO₃)₂ を完全に溶かす。

両方の試薬が完全に溶解したところで、ビオシチン溶液を白金溶液に添加し、暗所、室温で 210 分間反応させる。反応液の pH は 7.0 に維持する必要があり、そのために反応の間モニタして必要に応じ H₂O または HNO₃ を加える。

生成物 [Pt(en)(ビオシチン-X)(NO₃)]NO₃ を凍結乾燥し単離する。

生成物の安定性は、Ptがビオシチン-Xのアミノ基だけでなくカルボキシリ基にも結合することで保証される。白金化合物と後者との結合速度が優位となって、キレート環が形成され、重合反応が起こらなくなるため、それが一旦水に溶解すると生成物を安定化させると見做される。

下表に [Pt(en)(ビオシチン-X)(NO₃)]NO₃ の元素分析値を示す。

表 III

BIO-ULS [Pt(en)BIO]NO ₃		Mw = 689.6		
	A	B	△ A - B	理論値
試料 1 :	31.49 % C	31.42 % C	-0.064 %	31.50 %
	5.63 % H	5.40 % H	+0.374 %	5.89 %
	13.2 % N	13.0 % N	-1.24 %	14.34 %
	18.3 % Pt	18.5 % Pt	-0.95 %	28.35 %
	3.65 % S	3.67 % S	-1.0 %	4.66 %
	19.2 % O	19.0 % O	-2.826 %	21.926 %
	3.23 % Na			

C 1 試験を行うには試料不足であった。

実施例 3

白金エチレンジアミンジゴキシゲニン^R - L-リジンナイトレートの調製

[Pt(en)(ジゴキシゲニン-X)(NO₃)]NO₃

Pt(en)(NO₃)₂ (0.062 mmol, 23.65 mg) をメタノール 20 ml に加え、50°C に加熱して完全に溶解する。

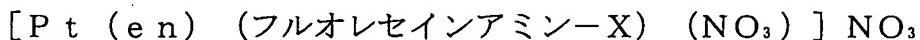
ジゴキシゲニン-L-リジン (4.5.3 mg) をメタノール 20 ml に加え、固形物が完全に溶解するまで加熱する。

両方の溶液を混合して、少なくとも 3 時間反応させる。最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離する。ジゴキシゲニン^R は、ベーリング・マンハイム社の登録商標である。

実施例 4

蛍光性白金(en)化合物の調製

白金エチレンジアミン-フルオレセインアミン-ナイトレートの調製



全反応を暗所で実施する。

 $\text{Pt}(\text{en}) (\text{NO}_3)_2$ (0. 25 mmol, 94. 8 mg) を 10 ml メタ

ノール / 2 ml 水に加え、加熱溶解する。

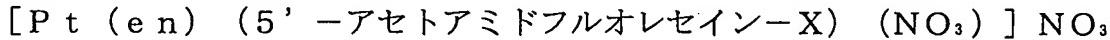
フルオレセインアミン (0. 27 mmol, 95. 5 mg, シグマ) を 10 ml のメタノールに溶解する。

フルオレセインアミン溶液を白金溶液に加え、直後の色の変化を観察する。

少なくとも 3 時間反応させる。結晶性の最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離し、凍結乾燥する。

実施例 5

白金エチレンジアミン-5'-アセトアミドフルオレセイン-ナイトレートの調製



全反応を暗所で実施する。

 $\text{Pt}(\text{en}) (\text{NO}_3)_2$ (0. 047 mmol, 17. 8 mg) を メタノール 5 ml に加え、加熱溶解する。

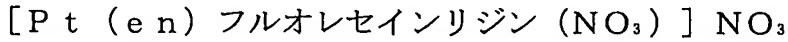
5'-アセトアミドフルオレセイン (0. 049 mmol, 20 mg, モレキュラ・プローブ・インク) を 10 ml のメタノールに溶解する。

アセトアミドフルオレセイン溶液を白金溶液に加え、少なくとも 3 時間反応させる。

最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離する。

実施例 6

白金エチレンジアミン-ε-(6-(フルオレセイン-5-カルボキサミド)ヘキサノイル)-L-リジン-ナイトレートの調製



全反応を暗所で実施する。

Pt(en) (NO₃)₂ (0.077 mmol, 29.17 mg) をメタノール 10 ml に加え、加熱溶解する。

$\epsilon - (6 - (\text{フルオレセイン-5-カルボキサミド}) \text{ヘキサノイル}) - L - \text{リジン}$ (0.081 mmol, 50 mg) をメタノール 10 ml に溶解する。

フルオレセイン溶液を白金溶液に加え、少なくとも 3 時間反応させる。最終産

物をロータリエヴァポレーションにより単離する。

実施例 7

白金エチレンジアミン-5-（および 6）-（(N-(5-アミノペンチル)アミノ)カルボニル）テトラメチルローダミン-ナイトロレートの調製

[Pt(en) (テトラメチルローダミン・カダベリン) (NO₃)] NO₃

全反応を暗所で実施する。

Pt(en) (NO₃)₂ (0.074 mmol, 28 mg) をメタノール 10 ml に加え、加熱溶解する。

テトラメチルローダミン・カダベリン (0.077 mmol, 40 mg, モレキュラ・プローブ・インク) をメタノール 10 ml に溶解する。

両溶液を混ぜ合わせ、少なくとも 3 時間反応させる。

最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離する。

実施例 8

白金エチレンジアミン-カスケード・ブルー^R・カダベリン・ナイトレートの調製

Pt(en) (カスケード・ブルー・カダベリン) (NO₃)] NO₃

Pt(en) (NO₃)₂ (0.057 mmol, 21.6 mg) を脱ミネラル水 10 ml に加え、50℃に加熱して完全に溶解させる。

カスケード・ブルー・カダベリン (0.06 mmol, 40 mg, モレキュラ・プローブ・インク) を脱ミネラル水 10 ml に溶解する。

両溶液を混ぜ合わせ、少なくとも 3 時間反応させる。

最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離する。

カスケード・ブルー^R は、モレキュラ・プローブ・インクの登録商標である。

実施例9

白金エチレンジアミン-4, 4-ジフルオロー-5, 7-ジメチル-4-ボラ-3a, 4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオニルエチレンヂアミン-ナイトレートの調製

Pt(en) (BODIPY^R 530/550 C3EDA) (NO₃)] N

O₃

Pt(en) (NO₃)₂ (0.052 mmol, 19.66 mg) をメタノール10mlに加え、加熱溶解する。

BODIPY 530/550 C3EDA (0.0545 mmol, 25.6 mg, モレキュラ・プローブ・インク) をメタノール10mlに溶解する。

両溶液を混和し、少なくとも3時間反応させる。

最終産物をロータリエヴァポレーションにより単離する。

BODIPY^R は、モレキュラ・プローブ・インクの登録商標である。

実施例10

白金エチレンジアミン-N-ε-(5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニル)-L-リジン-ナイトレートの調製

[Pt(en) (ダニシル・リジン) (NO₃)] NO₃

Pt(en) (NO₃)₂ (0.125 mmol, 47.5 mg) を脱ミネラル水20mlに加え、50℃に加熱して完全に溶解させる。

ダニシル・リジン (0.13 mmol, 50 mg, モレキュラ・プローブ・インク) を脱ミネラル水20mlに溶解し、0.4M水酸化ナトリウムでpH7～8に調整する。

両溶液を混和し、少なくとも3時間反応させる。最終産物は凍結乾燥により単離する。

実施例11

Pt(en)-化合物をDNAにカップリングする反応

DNA分子をPt(en)-化合物で標識する典型的な反応

5 μg の二本鎖DNAを超音波処理するか、あるいはDNase (ディーエヌ

エース)で処理して300~500bpの断片とする。これに6μgのPt(en)-化合物を加え、その容量を50μlに調整する。反応混合物を65℃で1時間保温する。未結合のPt(en)-化合物を100μlのNADTC溶液を添加してブロックする。Pt(en)-化合物で標識されたDNAはセファデックスG-50のカラムで精製する。このように簡単に標識し、精製したDNA

は-20℃で保存するか、そのままDNAプローブによるアッセイに使用する。Pt(en)-化合物で標識したDNAプローブは、少なくとも2年間はその活性および/または特異性を失うことなく-20℃で保存することができる。

上記の全ての応用例は、このプロトコールに従って標識したプローブを用いて実施される。

実施例12

白金エチレンジアミンローダミン123-ナイトレートの調製

[Pt(en)(ローダミン123)(NO₃)]NO₃

全反応を暗所で実施する。

Pt(en)(NO₃)₂(0.058mmol, 21.9mg)をN,N-ジメチルホルムアミド10mlに加え、加熱溶解させる。

ローダミン123(0.060mmol, 22.8mg)をN,N-ジメチルホルムアミド8mlに溶解する。ローダミン溶液を白金溶液に加え、少なくとも3時間反応させる。生成物は、ロータリエヴァポレーションにより単離する。

実施例13

白金エチレンジアミン-(7-アミノ-4-メチルクマリン)-ナイトレートの調製

[Pt(en)(7-アミノ-4-メチルクマリン)(NO₃)]NO₃

全反応を暗所で実施する。

Pt(en)(NO₃)₂(0.098mmol, 37.0mg)を25mlメタノール/2ml脱ミネラル水に添加し、加熱溶解させる。7-アミノ-4-メチルクマリン(0.10mmol, 18mg)をメタノール10mlに溶解する。7-アミノ-4-メチルクマリン溶液を白金溶液に加え、少なくとも4時間反

応させる。生成物は、ロータリエヴァポレーションにより単離し、凍結乾燥する。

実施例14

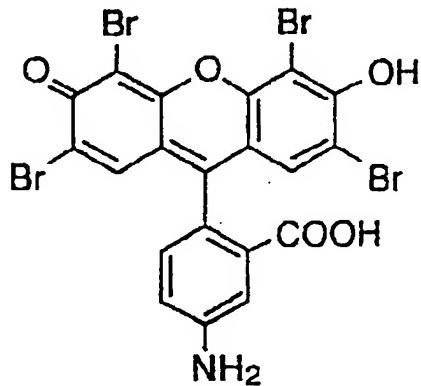
白金エチレンジアミン-5-アミノエオジン-ナイトレートの調製

[Pt(en)(5-アミノエオジン)(NO₃)]NO₃

全反応を暗所で実施する。

Pt(en)(NO₃)₂(0.068mmol, 25.6mg)をN,N-ジメチルホルムアミド15mlに加え、加熱溶解させる。5-アミノエオジン(0.075mmol, 50mg)をN,N-ジメチルホルムアミド10mlに溶解する。5-アミノエオジン溶液を白金溶液に加え、少なくとも4時間反応させる。生成物は、ロータリエヴァポレーションにより単離する。

5-アミノエオジン：モレキュラ・プローブ(A-117)より購入可能



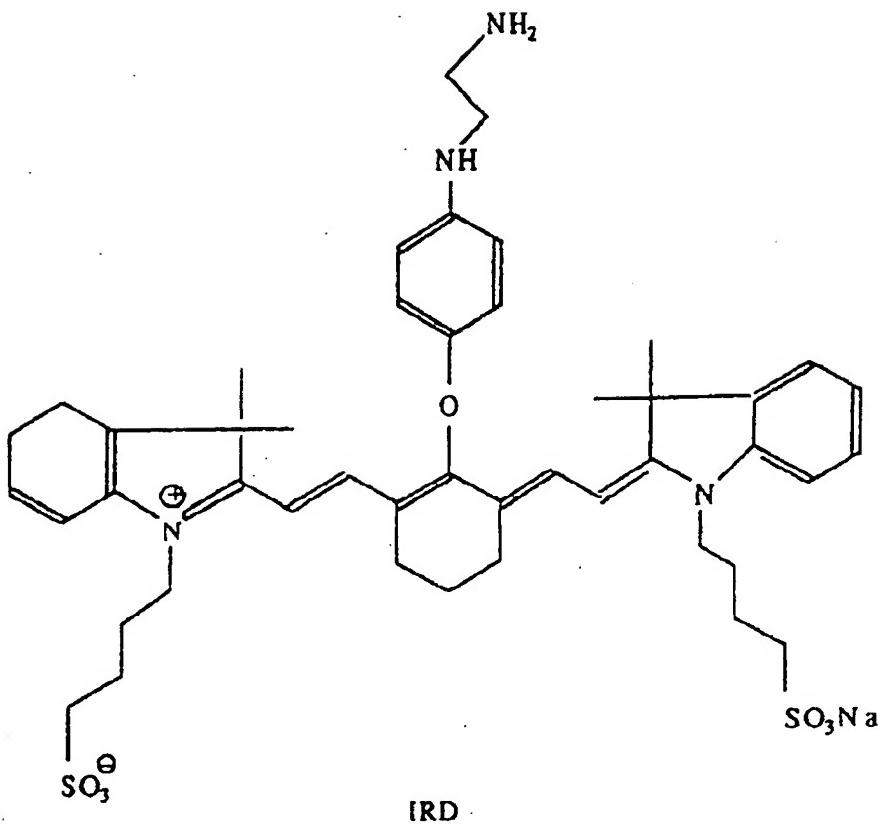
実施例15

白金エチレンジアミン-5-IRD-ナイトレートの調製

[Pt(en)(IRD)(NO₃)]NO₃

全反応を暗所で実施する。

Pt(en)(NO₃)₂(0.008mmol, 3.2mg)をN,N-ジメチルホルムアミド5mlに加え、加熱溶解させる。IRD(下記参照)(0.009mmol, 7.5mg)をN,N-ジメチルホルムアミド5mlに溶解する。IRD溶液を白金溶液に加え、少なくとも3時間反応させる。生成物は、ロータリエヴァポレーションにより単離する。



実施例 16

汎用結合方式によるDNAプローブのビオチン標識

序論

この標識法は、*in situ*ハイブリッド形成（ISH）のためにDNAプローブをビオチンで標識するのに使用されている。本実施例では品質管理手続のためのプロトコールとデータを含む標識手技を提示している。ビオチン標識のために、プラスミドでクローン化したヒト・パピローマウイルス・タイプ6（HPV, 40%GC塩基対）の全DNAを用いた。

実験手技

プラスミドDNAの調製

ヒト・パピローマウイルス・タイプ6の全DNAをベクタ pSP-64にクローン化した。プラスミドDNAを大腸菌（E. coli）（C-600）に導入し、アンピシリン含有LBプレート上に移植した。單一コロニーが一夜で大きな細胞集団に成長した。プラスミドDNAはバーンボイムとドリーの方法1に従って

単離し、セファロースC1-2B（ファルマシア）によるカラムクロマトグラフィにより精製し、制限酵素分析により挿入断片を調べた。プラスミドDNAの濃度はA₂₆₀/A₂₈₀の吸光度により定量した。エタノール沈殿の後、DNAを10mMトリス・塩酸（pH7.2；0.3mMEDTA）に最終濃度が1μg/μlとなるように溶解した（バッチ#150894）。次いで、このDNAを氷上10分間ずつ3回超音波（ソニープレッピング150、MSE）処理した。

得られたDNA断片のサイズは2%アガロース・ゲル電気泳動で測定し、200～400塩基対であることが判明した（バッチ#051094）。

プラスミドDNAの標識化および精製

プラスミドHPV-6 DNAを以下の試薬と混合することによりビオチン-ULSで標識した。

プラスミドHPV-6 DNA（バッチ#051094） 5μl (1μg/μl)

ビオチン-ULS標識化試薬（バッチ#BX940830） 8μl (1μg/μl)

脱ミネラル水(<0.2/μS/cm) 37μl

50μlの反応混合物を85℃で15分間インキュベートした。

過剰の標識化試薬を50μlのジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（2%脱ミネラル水溶液）を加えて捕捉し、室温で30分間放置した。

S300HRミクロスピニカラム（ファルマシア）によるサイズ排除クロマトグラフィで未結合のビオチン-ULSを除去した。

溶出容量を500μlとして10ng/μl濃度のビオチンHPVV-6プローブ（バッチ#061094）を得た。

検出限界の品質管理

ビオチン・プローブの検出限界を以下のプロトコールに示す直接スポットプロット（点染）および逆ろ紙ハイブリッド形成により決定した。

直接スポットプロット

ビオチン標識したHPV-6プローブ（バッチ#061094）を900mM塩化ナトリウム、90mMクエン酸ナトリウムおよび200μg/ml一本鎖サケ精子DNAから成るスポットバッファに10倍系列希釈し、1μl当たり100

0～0.1 p g の希釈系列とした。

1 μ l ずつのスポットをニトロセルロース膜（メンブレン）に載せ、80°Cで2時間加温放置してDNAを結合させた。ストレプトアビジンーアルカリフィオスマターゼ接合体（シグマ）をNBT/BCIP沈殿基質溶液（シグマ）と組み合わせて用い、ビオチンプローブを以下のプロトコールに従い可視化した：

- メンブレンを0.5%ツイーン20含有TBS溶液（TBS-T）に5分間侵漬する。
- メンブレンをストレッパーAP（3DEA U/m1）と共にTBS-T中、37°Cで15分間加温放置する。
- NC-メンブレンを5分間ずつ3回TNS溶液中で洗浄し、次いで脱ミネラル水により5分間洗浄した。
- メンブレンをNBT/BCIP基質溶液と37°Cで15分間加温放置し、次いで脱ミネラル水にて洗浄、空気乾燥した。

結果

この方法によるビオチンDNAプローブの検出限界は、1 p g以下であった。

逆ろ紙ハイブリッド形成

HPV-6 DNA（バッチ051094）を0.1N水酸化ナトリウムで1/10に希釈し、100°Cで5分間加温放置し、次いで直接氷の上に置いて一本鎖DNAとした。冷却した0.1N水酸化ナトリウムで10倍系列希釈して、1 μ l当たり10,000～1 p g DNAの系列液とした。1 μ l ずつのスポットをナイロン・メンブレン（ベーリングガ・マンハイム）に載せ、風乾した。ビオチン標識HPV-6 DNAプローブを5xSSPE/0.5%SDS溶液で希釈し、200ng/m1濃度の溶液を得た。この溶液を100°Cで5分間加温放置した後、5分間直接氷につけた。

目標のDNAを含有するナイロン・メンブレンを2xSSCに5分間侵漬し、次いで一本鎖プローブ溶液で37°C 2時間加温放置した。過剰のビオチンプローブを2xSSPE/0.1% SDSで37°C 10分間ずつ3回処理して除去し、次いで5分間TBS-Tで加温処理した。

ビオチンプローブは、直接スポット・プロット法で述べたと同じプロトコールを実施、可視化した。

結果

この方法によるビオチンDNAプローブの検出限界は10 pg以下であった。

In situハイブリッド形成の実施

試験材料は、オルガノシラン被覆ガラススライドに載せたHPV-6陽性頸部コンジローマの6 μmパラフィン切片であった。以下のプロトコールを用いた（特に断らない限り、各工程は室温で行う）：

1. パラフィン切片はキシレンで3度脱蠅して、等級エタノールで水和した。
2. 切片をTBS Tで5分間すすいだ。
3. 切片を0.1N塩酸中、0.25%ペプシンで37°C 5分間消化し、等級エタノールで脱水後風乾した。
4. プローブ溶液10 μlを切片に注ぎ、カバースリップで被った。プローブ溶液とは、0.6M NaCl, 0.06Mクエン酸ナトリウム、35%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2.5xデンハート溶液および10 μl/m一本鎖さけ精子DNAから成るハイブリッド形成用混合物にビオチンHPV-6プローブDNA（バッチ#061094）を2ng/μlの濃度に溶解したものという。
5. スライドを95°Cのホットプレート上に5分間置き、プローブと標的DNAを同時に変性させた。
6. スライドを37°Cの加湿器に2時間入れてハイブリッド形成させた。
7. カバースリップを取り除き、スライドを15mM NaCl, 1.5mMクエン酸ナトリウムおよび5%ホルムアミドで3回洗浄した。
8. スライドをTBS Tですすいだ。
9. 切片をストレプトアビジンAP接合体（TBS T中の3DEA U/ml）で37°C 15分間保温処理した。
10. スライドをTBS T（3x）および脱ミネラル水（1x）でそれぞれ5分間洗浄した。

11. 切片をNBT／BCIP基質溶液37°C 15分間保温処理した。
12. スライドを脱ミネラル水で洗浄(3x)し、切片をグリセロール／ゼラチンに固定した。

結 果

この切片を用いて、HPV-6 感染細胞部分には青／紫色の沈殿を認め、残りの組織にはわずかなバックグランドを認めた。

結 論

結果によれば、ULS法で標識したDNAは好ましい標識検出限界を示す。ULS法は実施が迅速・容易であり、感度が高く、酵素処理工程を要しないなど、結果として再現性の高い、全製造工程のコストを低下し得る方法なので、研究目的、日常の、あるいは工業的標識核酸の製造に最適である。ULS法は、常用されている非同位体標識法と同等の有用な代替法を提供する。

一般文献

1. マニアティス・T. , サムブルーク・J. , フリッシュ・E. F. , モエレキュラ・クローニング、第二版、コールド・スプリング・ハーバ・ラボラトリ一・プレス、ISBN 0-87969-309-6.
2. ケラー・G. H. , マナック・M. M. , DNAプローブ、ストックトン・プレス、ISBN 0-333-47659-X.

適 応

1. いわゆるLIDA法(リンクDNAイムノ・アッセイ; Linked DNA immuno Assay)におけるP_t-DNAリンクの使用

LIDA法は少量のDNA(またはRNA)、たとえば、原料物質PCR增幅後のDNAの定量分析を可能とする。本方法は特異的DNA(RNA)プローブを使用し、かつ、迅速DNA(RNA)P_t-標識化工程を経るために操作が簡単なので、感度・特異性の高い方法である。

方法の記載:

本方法では、DNA(RNA)プローブの標識に迅速P_t標識化合物を使用する。

本方法では、異なる3種の手法が可能である。

1. DNA分子に交差結合する白金化合物を用いてDNAプローブ分子をプラスチック、ナイロンまたはニトロセルロースの表面に不可逆的に結合させる。次いで、DNA標的物の検出を典型的な標識化DNA/RNAプローブ（ニックトランスレーションまたは化学修飾、ランダムプライミング）により実施する。

2. 検出可能な基をDNAに結合させ、DNA分子をいわゆるDNAプローブとする。DNA化合物を表面に結合させるには、科学上既知の古典的方法により実施できる（特別に処理したマイクロタイタプレートに共有結合させる、DNA分子をニトロセルロースに焼き付ける、あるいはDNA分子をナイロンメンブレンに結合させる）。

3. 手法1および2の組み合わせ

手法1

固定化したDNAプローブはハイブリッド形成法により検体中の特定標的分子を捕捉するのに使用できる。形成されたハイブリッドを検出するには異なる方法を使用する；たとえば、第二の標識化DNAプローブを使用して標的DNA分子の異なる部分とハイブリッド形成させ、サンドイッチ型のハイブリッドを形成する。標識物は、常用の免疫検出法および発色法により検出することができる。

手法2

(増幅された) 検出可能なDNA(RNA)含有物をプロトコールに従って直接標識する。

過剰の標識物は、NaDDTCまたはチオウリューム(Thiooreum)を加えて失活させる。この手法が他の方法と異なる点は、標的物を検出するために、他のアッセイ法では標識したDNA(RNA)プローブを使用するのに対し、本方法では標的分子を標識する点にある。Pt-標識化合物(ULS)の素早い結合能力が、診断テスト手順(通常の結合時間は65°Cで60分を要する)におけるDNA結合工程の常用化を可能とする。

第二工程は、標的の特異プローブで予めコートしたマイクロタイタプレート中で行う。インキュベーションは安定な“標識化標的物”とプローブのハイブリッ

ド形成のために行う。標的分子を直接標識化することが面倒な二重ハイブリッド形成技術を無用のものとする；二重ハイブリッド形成法では一方のプローブを標的物の捕捉に使用し、もう一方の標識化プローブを固定化した標的物の検出に使用する。

本方法においては、プローブがマイクロタイタプレートのウエル表面に共有結合により結合してある。第二工程のインキュベーションは液中ハイブリッド形成が特徴であり、迅速に実施することができる。これが定量的DNAハイブリッド形成技術に対するこの手法の主要な革新的特徴の一つである。

手法3

DNAプローブまたはDNA標的物の固定化およびDNAプローブと標的物の標識化のためには、新たに開発されたP_t汎用標識化システムを用いることができる。これら二つのDNA結合方式は、“キャッチャ”（捕捉体）および“デテクタ”（検出体）の双方が第二の物質に結合する場合（ビオチン、ジゴキシゲニンのような検出可能な基またはプラスチックスティック、マイクロタイタプレート、メンブレンのような担体表面のいずれか）の一つのアッセイに組み合わせることができる。

方式の例：ヒトの診断薬におけるSTD関連微生物の検出（クラミジア、梅毒、エイズ、ヘルペス、淋疾、B-型肝炎）

2. P_t-DNA標識物のテストストリップ手技との組み合わせ使用および様式

“DNA侵漬スティック”

DNA侵漬スティック手技は、少量のDNA（またはRNA）の定量および半定量分析を可能とする；たとえば、PCR增幅後の、あるいは体液検体（血液、尿、汗など）に存在するものである。

この手技は特異的DNA（RNA）プローブを使用し、かつ、迅速DNA（RNA）P_t-標識化工程を経るために操作が簡単なので、感度・特異性の高い方法である。

この新開発のP_t標識物を用いることを特徴とする汎用性標識法は、DNA（

RNA) 分子を結合させるのに 3 種の方法で用いることができる。

1. 検出可能なマーカ基をポリヌクレオチド配列に結合させるのに使用することができる。

2. ポリヌクレオチド配列を固相 (プラスチック、メンブレン、ラテックス・ビーズ、ヒドロゾル、またはマイクロタイタプレート) に不可逆的に結合せるのに使用することができる。

3. 1 および 2 の組み合わせ

利点 1 :

この例では、テスト試料中の生物学的分析対象物の検出に二通りの方法がある

第一の方法では、DNA プローブを新開発の P_t 標識化合物を用いて標識できる。この標識化したプローブは標的の DNA 配列と一次プローブとの間に形成される、事前にメンブレン上に形成されたハイブリッドの検出に用いることができる。この方法で必須のことは、一次プローブが二次 P_t 標識プローブとは異なる標的物上の配列を認識することである。実際に、これはたとえば RNA ハイブリッド形成で達成され、その際にはポリ A プローブが全 RNA (ポリ T 端子により認識可能) をメンブレンに固定化するのに用いられる。

第二の方法はやや異なって、この場合には迅速で特異性の高い p_t 標識化を特徴とするので、標的物をテスト試料液中で標識することができる。この方法での処方は、標識化した標的物を適当なメンブレン上に固相化した特異的非標識 DNA プローブで捕捉することから成る。これが DNA / RNA へ応用した侵漬ステイック法である。

利点 2 :

DNA プローブまたは標的 DNA を固相化するには、非標識の P_t 化合物 (すなわち、二つの遊離結合部位を持つ P_t 化合物) が、DNA と担体 (プラスチック、メンブレン、マイクロタイタプレートなど) 表面との橋渡しとして用いられる。

これまでの科学では、自然な方法で DNA に結合する物質がほとんど知られていないなかったために、これは DNA 配列の捕捉分子として診断アッセイにおいての

有用性を著しく高めるものである。このP_t架橋分子を広めることで、DNA技術にとって新しい応用分野が広がりつつある。

利点3：実施例1および2の組み合わせ

一般法：特に、P_tリンカ分子をラテックスまたはヒドロゾル・アッセイに用いるのは興味深い。このリンカは、DNA分子と微少粒子のカップリングを可能にする。DNA分子は、標的物質とハイブリッドを形成することができる。陽性反応はDNAハイブリッド粒子化合物を架橋結合させ、粒子の凝集像として可視化することができる。

このようなテストは定量化可能であり、その凝集度は調整して、特定の波長で測定することができる。殊に、金粒子は最適波長が凝集後に移動するという固有の特性を有している。

3. 診断テスト手順においてP_t-マーカ化合物を用いる蛋白質の標識

P_t-マーカ化合物は特定の条件下で蛋白質構造と相互作用する能力を有し、DNAの結合条件とは異なる条件で、たとえば以下のような標識に使用することができる。

- a. テスト試料中の一次標的を検出するためのモノまたはポリクローナル抗体
- b. いわゆる拮抗原理に基づく試験法の抗原として用いる蛋白誘導体
- c. 他の化合物と特異的に相互作用することが知られている特別な蛋白構造物；ただし、互いに非免疫的な相互作用を生じるものである；たとえば、ストレプトアビシンとビオチン、およびプロテインAおよびBとイムノグロブリン。

標識化したトレーサ分子は、適当なテスト方式（侵漬スティック、ELISA、その他）によって、ある量のある種の生物分析対象物を定性的あるいは定量的測定するのに使用することができる。

4. 長期作用蛋白質

本発明P_tリンカの特に興味のある有力な用法は、生体内蛋白質（一般には生体分子）を安定化することである。該P_t化合物の治療上の利用は、治療薬（インシュリン、第III因子など）として使用される生体物質が体内では短期間の作用を示すということである。これらの物質をP_t化合物とカップリングさせる

ことは、これらの分子の半減期を引き延ばし、生体内で生成し使用される物質が長期作用することを可能にする可能性がある。このことは患者にトラブルを少なくし、高価な医薬・治療薬の使用がより効果的に成り得ることを示唆している。

5. 銀一増幅技術での白金化DNAプローブの検出

白金化DNA／RNAプローブは、試料材料中のDNA／RNA配列を検出するハイブリッド形成法に使用することができる。標的部位に白金化合物を導入することは、イオン性銀を金属性銀に還元するように特別に設計された化学反応において、Ag分子を沈殿させることを可能とする。Pt核の部位では、Pt核の触媒効果により金属性銀（黒色）の分解が起こる。

イオン性の銀は、溶液中還元剤（たとえば、水素化ホウ素ナトリウム、ヒドロキノン）で還元される。一定割合で铂金上に沈積する銀の量は増幅のためのインキュベーション時間に比例する。目に見えないPt核の可視化は、テスト試料中に黒色スポットの現れるのを実験的に観察して行う。

黒色スポットは特異的プローブが結合している部位、すなわち、特異的標的存在部位を意味している。この技術は、種々の微生物および遺伝子転座／異常検出のための迅速で容易な診断手技を可能とする。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 96/00198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07F15/00 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07F G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB,A,2 148 891 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) 5 June 1985 see claim 16. ---	8
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 5, no. 180 (C-79) [852] , 19 November 1981 & JP,A,56 103192 (YOSHINORI KITANI), 18 August 1981, see abstract ---	8
Y	EP,A,0 386 243 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 12 September 1990 see example 5 ---	8
Y	EP,A,0 282 672 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) 21 September 1988 see claim 7 ---	8
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 August 1996

Date of mailing of the international search report

20.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5812 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kapteyn, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. International Application No.
PCT/NL 96/00198

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 207 416 (J.D. HOESCHELE) 10 June 1980 see claim 1 ---	9,10
A	WO,A,92 01699 (STICHTING KLINISCHE RESEARCH ACADEMISCH ET AL) 6 February 1992 cited in the application * complete document * -----	9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL96/00198

Box 1 Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

 - Claims Nos.: 1-7 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The preparation method of claims 1 to 7 are incomplete. It is not clear under which conditions the starting materials are converted to the claimed linkers.

 - Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 96/00198

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB-A-2148891	05-06-85	JP-C- JP-B- JP-A- BE-A- DE-A- FR-A,B NL-A- SE-A- US-A-	1725766 4012277 60087295 900842 3438440 2553777 8403087 8405188 4607114	19-01-93 04-03-92 16-05-85 18-04-85 02-05-85 26-04-85 17-05-85 20-04-85 19-08-86
EP-A-0386243	12-09-90	JP-A- JP-B- JP-A- WO-A-	2000294 7062023 1249791 8904317	05-01-90 05-07-95 05-10-89 18-05-89
EP-A-0282672	21-09-88	JP-A- CA-A- US-A- US-A- US-A-	63203692 1292749 4861985 4987246 5128493	23-08-88 03-12-91 29-08-89 22-01-91 07-07-92
US-A-4207416	10-06-80	AU-B- CA-A- CH-A- DE-A- FR-A,B GB-A- JP-A- SE-B- SE-A- US-A-	8455375 1034120 617587 2539179 2283692 1526210 51054916 424870 7509769 4080324	10-03-77 04-07-78 13-06-80 18-03-76 02-04-76 27-09-78 14-05-76 16-08-82 08-03-76 21-03-78
WO-A-9201699	06-02-92	NL-A- AU-B- EP-A-	9001639 8286391 0539466	17-02-92 18-02-92 05-05-93

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF,
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ,
UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ
, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR
, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT
, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 イエルスマ, ティンカ

オランダ国 1326 デーヘー アルメレ
ケルセボームストラート 39

(72) 発明者 フアン エス, レムコ マリア

オランダ国 1541 エヌエル コーグ ア
ーノデー ザーン ヘナラント 25

(72) 発明者 フアン デン ベルフ, フランシスキュス
ミシエル

オランダ国 2134 イエーベー ホーフト
ドルプ クラーターボス 75

(72) 発明者 レンペルス, エドワイン レオ マリオ
オランダ国 1788 ヘーベー ユリアナド
ルプ フォーヘルザント 2231

(72) 発明者 ブルーミング, マリーヶ ヨハンナ
オランダ国 2341 エルエム ウーフスト
ヘースト ホフブルーケルラーン 31